



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**Corso di Laurea Specialistica in
Medicina e Chirurgia**

Tesi di Laurea

**“Effetto della grelina esogena sulla funzione endoteliale
nelle piccole arterie di pazienti con ipertensione
arteriosa essenziale”**

Relatore: Chiar.^{mo} Prof. Agostino Virdis

Candidato: Matteo Frugoli

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

1. Riassunto	pag.5
2. Introduzione	9
2.1 Anatomia e fisiopatologia delle cellule endoteliali	9
2.2 Valutazione della funzione endoteliale nell'uomo	15
2.3 Disfunzione endoteliale	19
2.3.1 <i>Disfunzione endoteliale e ipertensione arteriosa</i> <i>nell'uomo</i>	20
2.4 Meccanismi della disfunzione endoteliale nell'ipertensione essenziale	22
2.4.1 <i>Alterazioni della via metabolica dell'NO</i>	22
2.5 La grelina	25
2.5.1 <i>Storia ed effetti metabolici</i>	26
2.6 Effetti cardiovascolari della grelina	28
2.6.1 <i>Effetti cardiaci della grelina</i>	29
2.6.2 <i>Effetti vascolari della grelina</i>	33
2.6.3 <i>Meccanismi coinvolti nella protezione vascolare</i> <i>della grelina</i>	35
2.7 Grelina e condizioni patologiche	38

2.7.1	<i>Grelina e Sindrome Metabolica</i>	38
2.7.2	<i>Grelina ed ipertensione</i>	41
3.	Studio	44
3.1	Scopo della tesi	44
3.2	Metodi	45
3.2.1	<i>Popolazione dello studio</i>	45
3.2.2	<i>Modello sperimentale</i>	45
3.3	Disegno dello studio	46
3.3.1	<i>Valutazione del ruolo di L-NMMA od acido ascorbico sulla risposta vascolare all'Acetilcolina. Effetto della grelina</i>	47
3.3.2	<i>Valutazione del ruolo di L-NMMA ed acido ascorbico sulla risposta vascolare all'Acetilcolina. Effetto della grelina</i>	49
3.3.3	<i>Effetto della grelina in acuto su marcatori plasmatici di stress ossidativo e infiammazione</i>	49
3.4	Analisi statistica	50
3.5	Risultati	51
3.5.1	<i>Risultati basali nei soggetti ipertesi essenziali e nei normotesi</i>	52

3.5.2	<i>Effetto della grelina sulla vasodilatazione endotelio-</i>	
	<i>dipendente</i>	54
3.5.3	<i>Effetto della grelina sui marcatori plasmatici di</i>	
	<i>infiammazione e stress ossidativo</i>	56
3.6	Discussione	57
4.	Bibliografia	61

1. RIASSUNTO

L'endotelio costituisce il rivestimento cellulare interno di vasi sanguigni e linfatici e svolge anche un ruolo primario nella regolazione del tono vascolare tramite la produzione di sostanze che inducono vasocostrizione e rilascio. Il monossido di azoto (NO) rappresenta una delle più importanti sostanze ad azione vasodilatatoria sintetizzate dall'endotelio e viene prodotto dall'enzima NOS sia in maniera costitutiva che dopo stimolazione. Un sovvertimento di queste proprietà caratterizza una condizione denominata disfunzione endoteliale, nella quale è presente un'alterazione funzionale delle cellule endoteliali in assenza di vero e proprio danno strutturale. Viene infatti ad essere alterato l'equilibrio tra agenti vasodilatatori e loro antagonisti, e questo accade per la presenza dei ROS che determinano una ridotta biodisponibilità di NO tramite la sua distruzione. La presenza di disfunzione endoteliale è stata dimostrata nell'ambito dell'ipertensione essenziale in numerosi studi, dove si osservato che questi pazienti presentano una ridotta capacità vasodilatatoria endotelio-dipendente in risposta ad acetilcolina ed altri agonisti recettoriali.

La grelina è un peptide secreto dalle cellule dello stomaco con importanti attività nell'ambito del sistema metabolico e della regolazione del bilancio energetico. La sua somministrazione induce l'aumento di peso stimolando l'intake di cibo e riducendo l'utilizzazione del grasso corporeo. I suoi effetti si manifestano inoltre a livello del sistema endocrino determinando la secrezione di GH ed altri ormoni ipofisari. Recenti evidenze dimostrano un'attività di questo peptide anche a livello del sistema cardiovascolare ed è stato osservato che l'infusione intravenosa di grelina è in grado di migliorare l'output e la contrattilità cardiaca di soggetti sani, come di avere un effetto benefico in varie condizioni patologiche come l'infarto e lo scompenso cardiaco. A livello dei vasi periferici la grelina ha un ruolo nella modulazione della funzione endoteliale stimolando in maniera dose-dipendente la produzione di NO ed antagonizzando la contrazione ET-1-mediata tramite attività antiossidanti. Gli effetti di questo peptide sono stati inoltre studiati nell'ambito di condizioni patologiche caratterizzate da un'alterata funzionalità dell'endotelio. In pazienti con sindrome metabolica è stato osservato che l'infusione di grelina aumenta la disponibilità di NO e riduce l'attività di ET-1 migliorando la condizione di disfunzione endoteliale presente in questi pazienti a causa dell'aumentata produzione

di ROS. Il ruolo di questo peptide è stato indagato anche nell'ipertensione dove essa mostra la capacità di ridurre i livelli di pressione arteriosa ma non vi sono dati a riguardo della sua attività sulla funzione endoteliale.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di andare a valutare se l'infusione esogena di grelina potesse migliorare la condizione di disfunzione endoteliale nel microcircolo dell'avambraccio di pazienti con ipertensione essenziale e valutare inoltre la possibilità che gli effetti benefici sulla funzione endoteliale potessero essere attribuiti ad un miglioramento dello stress ossidativo e dello stato di infiammazione di basso grado presente in questi pazienti. La tecnica utilizzata per lo studio è stata quella dell'avambraccio isolato e perfuso.

I risultati ottenuti hanno intanto mostrato che i pazienti ipertesi essenziali possiedono in condizioni basali una ridotta capacità vasodilatatoria in risposta all'acetilcolina rispetto ai normotesi e che questa condizione è dovuta ad una ridotta biodisponibilità di NO causata da un aumentato stress ossidativo. Inoltre, è stato osservato che l'infusione di grelina esogena è in grado di incrementare la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente ristabilendo la disponibilità endoteliale di NO e riducendo lo stress ossidativo.

In conclusione quindi, i risultati di questa tesi dimostrano che l'infusione acuta di grelina esercita un importante effetto benefico a livello del microcircolo di pazienti affetti da ipertensione essenziale andando a migliorare la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente e ripristinando la biodisponibilità di NO attraverso un'attività antiinfiammatoria ed antiossidante.

2. INTRODUZIONE

2.1 Anatomia e fisiopatologia delle cellule endoteliali

L'endotelio, rivestimento cellulare interno di vasi sanguigni e linfatici, sebbene sia stato considerato in passato come una barriera cellulare in grado unicamente di favorire il passaggio bidirezionale di macromolecole e gas fra sangue e tessuti, è un organo molto attivo metabolicamente, coinvolto in numerosi processi fisiopatologici, come il controllo del tono vascolare, l'aggregazione piastrinica, l'adesione leucocitaria e l'infiammazione¹. Anatomicamente esso è composto da un singolo strato di cellule mesenchimali e la maggior parte del suo spessore è determinato da una struttura disposta sulla sua superficie luminale denominata strato superficiale endoteliale. Tale struttura è composta da proteine, glicolipidi, glicoproteine e glicosamminoglicani e ospita recettori per molecole di adesione, componenti del sistema di coagulazione/fibrinolisi e molecole con funzione di trasduzione meccanica dello stress fisico provocato dal flusso sanguigno sull'endotelio². Il ruolo dell'endotelio nella modulazione del tono vascolare è esercitato tramite la produzione di

sostanze con funzione opposta, vasodilatorie e vasocostrittorie: questa produzione viene bilanciata in maniera da poter prendere parte in ogni momento alla regolazione locale del flusso ematico e del calibro vascolare (figura 1). Esistono varie sostanze endogene prodotte dall'endotelio in condizioni fisiologiche con funzione vasodilatatoria e tra queste una delle più importanti è sicuramente il monossido di azoto (NO). Esso è un gas volatile con breve emivita che viene prodotto dalla trasformazione della L-arginina in citrullina ad opera dell'enzima NO-sintetasi (NOS) ed il suo ruolo nella vasodilatazione endotelio-dipendente è stato dimostrato tramite tecniche spettrografiche da Ignarro nel 1989³. Il NO, diffondendo rapidamente dalle cellule endoteliali verso le cellule muscolari lisce, determina rilassamento e vasodilatazione attraverso la modulazione dell'attività di enzimi specifici che lo legano come la guanilato-ciclastasi. L'aumento di cGMP che ne deriva è responsabile della fosforilazione di proteine contrattili e strutturali della cellula come la calponina, il fosfolambano e la tropomiosina e della riorganizzazione delle strutture citoscheletriche e della sensibilità di queste alle azioni degli ioni calcio, necessari alla contrazione. Esistono diverse forme dell'enzima NOS, endoteliale (eNOS), neuronale (nNOS) e inducibile (iNOS). Di queste, le prime due vengono espresse

costitutivamente dalle cellule endoteliali ed hanno un'attività Ca-Calmodulina dipendente, mentre la iNOS viene attivata in condizioni di infiammazione e non è correlata col complesso Ca-Calmodulina. Le cellule endoteliali dei vasi sanguigni secernono NO tonicamente in maniera fisiologica, ma possono incrementarne dinamicamente la produzione in risposta all'aumento dello shear stress (sollecitazione provocata dallo scorrimento del sangue sulle pareti dei vasi sanguigni) in maniera da adattare la perfusione dei vari organi in funzione del flusso sanguigno e fanno questo tramite l'attivazione della isoforma eNOS⁴.

Quest'enzima inoltre può essere attivato da numerose altre sostanze come come acetilcolina, bradichinina, adenosina, fattori di crescita endoteliali (in risposta all'ipossia) e serotonina (rilasciata durante l'aggregazione piastrinica). L'NO inoltre, assume un ruolo importante nel controllo e nella inibizione dei meccanismi patogenetici del danno endoteliale che si verifica nell'aterosclerosi tramite un'azione inibitoria sull'aggregazione piastrinica, sulla proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce di parete, sulla sintesi di endotelina e sull'infiammazione di parete⁵.

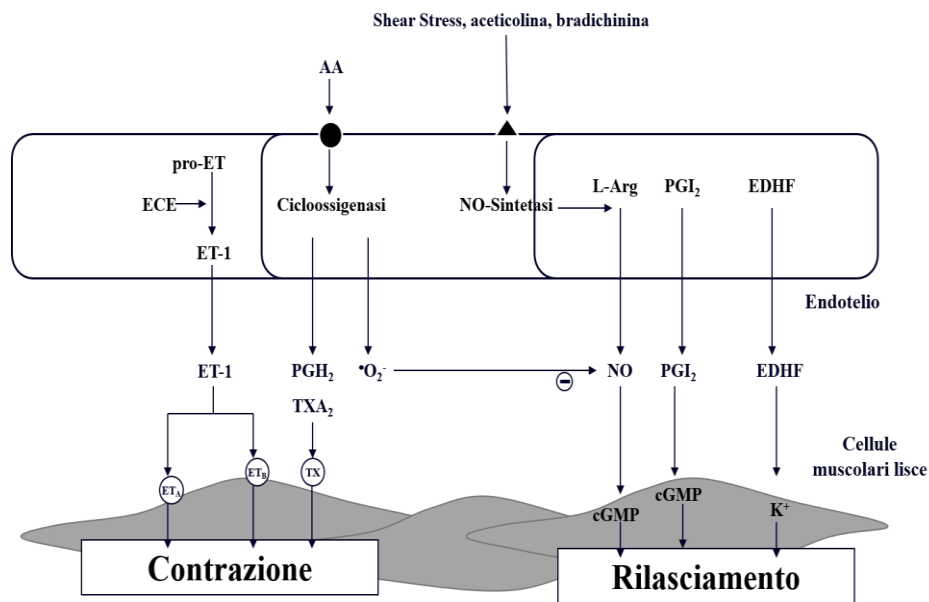


Figura 1: sostanze di origine endoteliale coinvolte nella regolazione del tono vascolare. Le principali sostanze ad azione vasodilatatoria comprendono il monossido di azoto (NO), la prostaciclina PGI₂ e il fattore iperpolarizzante di origine endoteliale (EDHF). La produzione di NO avviene attraverso la trasformazione della L-arginina in citrullina ad opera dell'enzima NO-sintetasi (NOS), e viene attivata sia da agonisti recettoriali che da stimoli meccanici. L'endotelio produce inoltre sostanze ad azione vasocostrittoria tra le quali l'endotelina-1 (ET-1). Fattori cicloossigenasi-dipendenti quali il trombossano A₂ (TXA₂), la prostaglandina H₂ (PGH₂) e gli anioni superossido (O₂⁻), relizzano inoltre una inibizione dell'NO sia di tipo funzionale che attraverso la sua distruzione.

Le cellule endoteliali sono inoltre coinvolte nella produzione di altre sostanze ad azione vasodilatatrice in aggiunta all'NO, come ad esempio la prostaciclina PGI₂ (che provoca rilassamento aumentando cAMP nelle cellule muscolari lisce) e un'altra sostanza ancora non ben identificata che determina il rilassamento delle cellule muscolari della parete vascolare tramite un meccanismo differente da quello utilizzato dal NO.

Questa sostanza infatti, tramite l'apertura dei canali del potassio, determina un'iperpolarizzazione di membrana che provoca una diminuzione dei livelli intracellulari di calcio inibendo l'afflusso dello stesso attraverso canali voltaggio-dipendenti, favorendo la ricaptazione di calcio all'interno dei depositi intracellulari e la sua estrusione dalla cellula. Tale sostanza di origine sconosciuta è stata denominata per questo motivo EDHF (endothelium derived hyperpolarizing factor), e secondo alcuni studi la sua importanza quale mediatore del rilassamento endotelio-dipendente sarebbe modesta nei vasi normali, ma molto più importante come meccanismo compensatorio in situazioni patologiche nelle quali è presente una ridotta biodisponibilità di NO⁶.

E' importante sottolineare come l'endotelio sia coinvolto, oltre che nella produzione di sostanze ad azione vasodilatatoria, anche in quella di sostanze vasocostrittrici, tra le quali l'endotelina (ET).

L'ET è uno tra i più potenti agenti vasocostrittori attualmente identificati, ed è stata originariamente isolata dal mezzo di coltura di cellule endoteliali aortiche. Oltre alla più potente ET-1, altre due isoforme (ET-2 ed ET-3) sono state successivamente isolate dal veleno del serpente *Atractapis engaddensis* ed il loro significato fisiologico non è chiaro. Il precursore inattivo dell'ET-1 è la pre-pro-ET, trasformata in pro-ET e

successivamente in ET ad opera di un enzima specifico denominato ECE (Endothelin Converting Enzyme) in ET⁷. Delle tre isoforme di questo peptide, l'ET-1 è l'unica ad essere prodotta dalle cellule endoteliali, oltre che dalle cellule muscolari lisce⁸, ed è responsabile degli effetti cardiovascolari di questo peptide. L'azione di ET-1 è mediata da due differenti recettori denominati ET_A e ET_B. Il primo, risulta avere un'affinità maggiore per l'isoforma ET-1 che per la ET-3 e sembra essere presente soprattutto sulle cellule muscolari lisce della parete vascolare, dove media l'effetto vasocostrittore indotto dall'endotelina. ET_B avrebbe invece all'incirca la stessa affinità per le varie forme di endotelina e risulta essere espresso oltre che dalle cellule muscolari lisce, anche dalle cellule endoteliali, dove a seguito del legame di ET-1 media una risposta vasodilatatoria transitoria tramite il rilascio di NO e prostacicline⁹.

Il NO rappresenta quindi il meccanismo di feed-back degli effetti dell'ET-1. L'infusione endogena di ET-1 determina infatti una condizione di transitoria vasodilatazione seguita da una importante vasocostrizione. In alcune condizioni patologiche come ipertensione, invecchiamento, diabete e aterosclerosi, i mediatori che determinano la sintesi del NO, parallelamente provocano la formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che hanno un ruolo nell'incrementare lo stress

ossidativo. I meccanismi che sono coinvolti nello stress ossidativo sono solo in parte conosciuti, ma si pensa che siano coinvolti sistemi enzimatici come quello della ciclo-ossigenasi (COX) endoteliale, che, oltre a determinare la produzione di endoperossidi ad azione vasocostrittoria come il trombossano A₂ e la prostaglandina H₂, determina la produzione di ROS. Essi realizzano inoltre un meccanismo di antagonismo sul NO sia funzionale, in quanto agenti vasocostrittori, sia attraverso la distruzione diretta del NO stesso.

2.2 Valutazione della funzione endoteliale nell'uomo

Gli studi di reattività vascolare risultano essere importanti per lo studio della reattività endoteliale in quanto forniscono risultati affidabili e riproducibili. La valutazione diretta della funzione endoteliale in vivo nell'uomo presenta infatti difficoltà legate al fatto che alcuni peptidi come l'NO risultano difficili da dosare data la brevissima emivita, mentre altri come l'ET-1 seppur dosabili, presentano delle concentrazioni ematiche che vengono influenzate da fattori esogeni come dieta e produzione di nitrati da parte di batteri in corso di infezioni urinarie.

Per questi motivi gli studi di reattività vascolare risultano essere ottimi metodi per la valutazione della funzione endoteliale. Con queste metodiche è possibile, tramite l'infusione a livello di specifici distretti corporei di agonisti (acetilcolina, metacolina, bradichinina, serotonina, sostanza P) e antagonisti (N^G -monometil-L-arginina, o L-NMMA), attivare o inattivare la produzione di NO da parte della NO-sintetasi. All'interno degli studi di reattività vascolare, la metodiche più utilizzate sono quelle della Flow-Mediated Dilation (FMD) e della pletismografia venosa tramite il modello dell'avambraccio isolato e perfuso (Forearm Blood Flow=FBF). La prima, è una tecnica non-invasiva che sfrutta l'aumento della forza tangenziale sulla parete vascolare in corso di iperemia (shear stress), che determina rilascio endoteliale di NO e conseguente vasodilatazione¹¹. La tecnica prevede la visualizzazione dell'arteria brachiale in un tratto rettilineo del vaso circa 2 cm al di sopra della piega del gomito mediante ultrasonografia con una sonda vascolare di 7,5 MHz; la misura del diametro vasale viene eseguita in condizioni di base e dopo un minuto di flusso iperemico, al picco della vasodilatazione mediata dallo shear stress. L'iperemia viene indotta tramite occlusione meccanica dell'arteria brachiale mediante gonfiaggio di un manometro a

pressioni maggiori di quelle arteriose sistemiche e successivo rilascio, dopo cinque minuti di collasso del vaso.

La maggior parte dei dati sulla funzione endoteliale nell'uomo comunque, è stata ottenuta con il FBF (figura 2): con questa tecnica, è possibile infondere sia sostanze ad azione vasodilatatoria endotelio-dipendente (acetilcolina, bradichinina, serotonina o sostanza P), sia sostanze come i nitroderivati (nitroprussiato di sodio o nitroglicerina), che mediano la vasodilatazione endotelio-indipendente agendo direttamente sulle cellule muscolari lisce, tramite cannulazione dell'arteria omerale previa anestesia locale con lidocaina. Tali sostanze, venendo infuse direttamente in arteria, si ritrovano ad elevate concentrazioni locali senza influire sull'emodinamica sistemica. Con questa tecnica è possibile determinare la presenza di un'alterata risposta contrattile e stabilire se essa dipenda da una disfunzione dell'endotelio o da un'alterata risposta contrattile delle cellule muscolari lisce. Per fare questo le due tipologie di vasodilatatori devono essere infuse in dosi equipotenti, in modo che i livelli di vasodilatazione siano così comparabili. La risposta vascolare all'infusione delle sostanze viene valutata tramite pletismografia strain-gauge (metodica che rileva le variazioni di circonferenza di una determinata sezione di un arto in

rapporto alle variazioni del flusso di sangue mediante un rilevatore costituito da un anello distensibile e da un sottile tubicino di Silastic ripieno di mercurio).

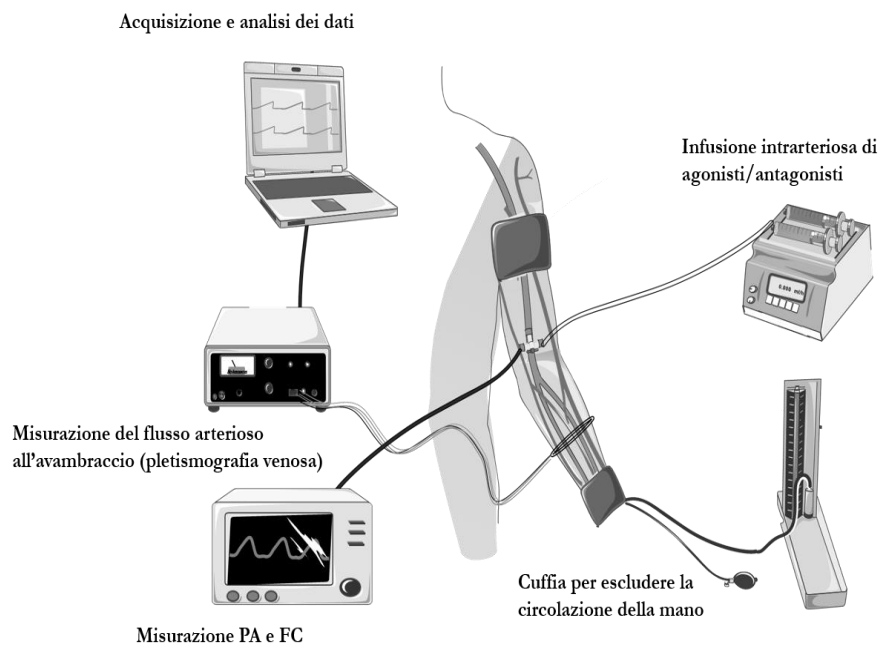


Figura 2: schema del modello del braccio isolato e perfuso per la valutazione della funzione endoteliale nell'uomo. L'arteria omerale viene cannulata per l'infusione di agonisti e antagonisti endoteliali. Con questo sistema si riesce ad ottenere elevate concentrazioni locali senza effetti emodinamici sistemici. La risposta vascolare all'infusione delle sostanze viene valutata misurando le modificazioni di flusso arterioso attraverso pletismografia strain-gauge.

Questa tecnica permette inoltre di determinare i meccanismi implicati nella disfunzione endoteliale andando a valutare il rispettivo ruolo della via L-arginina-NO, dei fattori vasocostrittori COX-dipendenti e dello

stress ossidativo. La prima via può essere valutata mediante la sua attivazione con Acetilcolina e mediante la sua inibizione con L-NMMA, mentre i fattori vasocostrittori COX-dipendenti vengono valutati inibendone la sintesi con indometacina (inibitore della COX). Infine per valutare la presenza di stress ossidativo si può utilizzare la vitamina C, sostanza ad azione antiossidante.

2.3 Disfunzione endoteliale

Con disfunzione endoteliale si intende una condizione caratterizzata da un'alterazione funzionale delle cellule endoteliali in assenza di un vero e proprio danno strutturale. Le cellule endoteliali sono quindi anatomicamente integre, e questo differenzia questa condizione dal danno endoteliale in cui, oltre la funzione, viene ad essere compromessa la struttura dell'endotelio. Nella disfunzione endoteliale viene ad essere alterato l'equilibrio tra agenti vasodilatatori e loro antagonisti, e questo accade per la presenza dei ROS che, distruggendo il NO, ne determinano una ridotta biodisponibilità. Questa condizione la si ritrova in pazienti

con fattori di rischio cardiovascolari acquisiti come ipercolesterolemia, diabete e in pazienti fumatori.

2.3.1 Disfunzione endoteliale e ipertensione arteriosa nell'uomo

La presenza di disfunzione endoteliale nel paziente iperteso è una condizione che è stata dimostrata in numerosi studi. Nel 1990 si sono svolti due differenti studi che per la prima volta hanno dimostrato nell'uomo la presenza di una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente a livello del microcircolo dell'avambraccio. Simili risultati sono stati ottenuti negli Stati Uniti da Panza e coll.¹² e in Europa da Linder e coll.¹³ Essi dimostrarono che, in pazienti ipertesi essenziali, la risposta a dosi crescenti di acetilcolina era significativamente ridotta rispetto a pazienti normotesi di controllo. Al contrario, la risposta al nitroprussiato di sodio (vasodilatatore endotelio-indipendente) era simile nei due gruppi, dimostrando che la ridotta capacità vasodilatatoria dipendeva unicamente da una causa endoteliale (figura 3).

Studi successivi hanno poi confermato tali risultati¹⁴⁻¹⁷, e si è anche notato come nei pazienti ipertesi sia presente una ridotta risposta ad altri agonisti recettoriali quali la metacolina¹⁸, la sostanza P¹⁹ e la

bradichinina²⁰⁻²¹, a stimoli che aumentano lo shear stress come la flow-mediated dilation²².

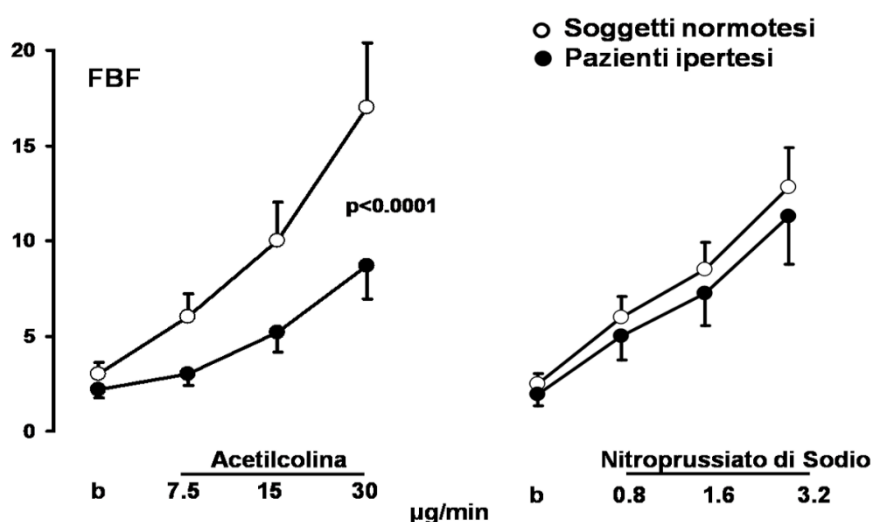


Figura 3: il grafico mostra l'incremento di flusso rispetto al basale indotto dall'infusione intra-arteriosa di acetilcolina (sinistra) e di nitroprussiato di sodio (destra) in soggetti normotesi e in pazienti con ipertensione essenziale. La risposta all'acetilcolina risulta ridotta nei soggetti con ipertensione essenziale rispetto ai normotesi, mentre ciò non avviene per il nitroprussiato di sodio. Tali dati dimostrano quindi la presenza di disfunzione endoteliale nei pazienti ipertesi.

La presenza di una condizione di disfunzione endoteliale è stata dimostrata anche in pazienti con forme di ipertensione arteriosa secondaria, come pazienti con iperaldosteronismo primitivo, ipertensione renovascolare¹⁷ e feocromocitoma²³ e sembra essere una condizione reversibile che regredisce dopo il trattamento della patologia che ne è la causa.

2.4 Meccanismi della disfunzione endoteliale nell'ipertensione essenziale

2.4.1 Alterazioni della via metabolica dell'NO

La disfunzione endoteliale che caratterizza i pazienti con ipertensione arteriosa è determinata da una ridotta biodisponibilità di NO, causata da una aumentata produzione di ROS. Questo meccanismo è ampiamente dimostrato da numerosi studi nei quali si è osservato che l'infusione di L-NMMA (inibitore della NOS) riduce significativamente l'effetto vasodilatatorio dell'acetilcolina nei pazienti normotesi, mentre è inefficace negli ipertesi^{15,17,26}.

Nei pazienti ipertesi l'infusione dell'antiossidante Vitamina C è in grado di normalizzare la risposta vasodilatante all'acetilcolina e contemporaneamente ripristinare l'effetto inibitore della L-NMMA sull'acetilcolina²⁷.

Nell'ultimo decennio è stato inoltre dimostrato che in presenza di una ridotta disponibilità di NO, nei vasi arteriosi dei pazienti ipertesi la vasodilatazione endotelio-dipendente è garantita da un meccanismo di compenso. Questo meccanismo è legato alla presenza del fattore iperpolarizzante EDHF (figura 4). In uno studio condotto nel

microcircolo dell'avambraccio, è stato dimostrato che nei pazienti ipertesi essenziali, ma non nei soggetti di controllo, la vasodilatazione endotelio-dipendente mediata dalla bradichinina veniva antagonizzata dalla ouabaina, un inibitore della pompa Na^+/K^+ ATPasi, uno dei meccanismi d'azione dell'EDHF²¹. Questa produzione compensatoria di EDHF si arrestava se si antagonizzava lo stress ossidativo tramite l'impiego di Vitamina C, che ripristinava la biodisponibilità del NO.

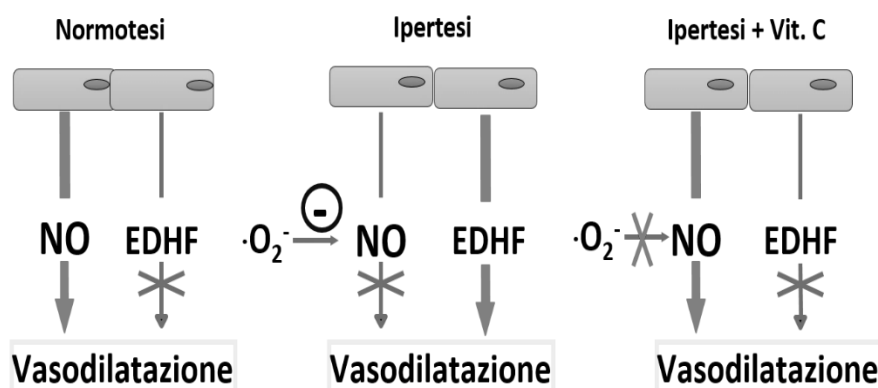


Figura 4: in questo schema sono descritti i meccanismi della vasodilatazione endotelio-dipendente presenti nei soggetti normotesi (sinistra), nei pazienti ipertesi (centro) e nei pazienti ipertesi ai quali è stata somministrata Vit. C, che funge da antiossidante. Nei soggetti normotesi, l'NO rappresenta il principale mediatore responsabile della vasodilatazione endotelio-dipendente mentre nell'ipertensione essenziale lo stress ossidativo inattiva l'NO e l'endotelio aumenta la produzione del fattore iperpolarizzante EDHF. Il blocco acuto dello stress ossidativo con vitamina C, ripristina la biodisponibilità di NO e annulla la produzione del fattore iperpolarizzante, dimostrando che quest'ultimo rappresenta un meccanismo compensatorio.

Alla luce di tutto questo si può quindi concludere che nei pazienti con ipertensione essenziale la presenza di stress ossidativo indotto dai radicali liberi riduce la biodisponibilità di NO. In queste circostanze, la ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente è garantita da un meccanismo compensatorio che opera tramite la produzione dell'EDHF.

2.5 La grelina

La grelina è un peptide di 28 amminoacidi isolato per la prima volta da Kojima M et al nel 1999 dallo stomaco di ratto e uomo²⁸. Esso deriva dal precursore preprogrelina ed è prodotto dalle cellule X/A-like, una importante popolazione cellulare endocrina localizzata a livello della mucosa gastrica²⁹. Sia a livello sierico che nello stomaco la grelina è presente in due isoforme, una de-acilata ed una acilata che rappresenta la forma biologicamente attiva³⁰. In condizioni di salute, la forma de-acilata è presente a livello sierico in una concentrazione maggiore rispetto alla forma acilata biologicamente attiva, anche se questo rapporto può variare in alcune condizioni patologiche come gastrite atrofica cronica, malattie renali croniche, anoressia nervosa, obesità o diabete di tipo II³¹. Sebbene per la maggior parte essa sia prodotta e rilasciata a livello dello stomaco, la sua espressione può essere ritrovata anche a livello di altri tessuti come ipofisi, ipotalamo, intestino, pancreas, rene, testicolo, ovaie, linfociti e placenta³², ed a livello di questi tessuti è stato anche ritrovato il corrispondente recettore (GHS-R) (figura 5)³². Esso è presente in due isoforme dette GHS-R 1a e GHS-R 1b. Il primo è un recettore associato a proteine G che lega la grelina e stimola la mobilizzazione di calcio

intracellulare, mentre GHS-R 1b non è in grado di legare la grelina e in definitiva la sua funzione deve ancora essere determinata³³.

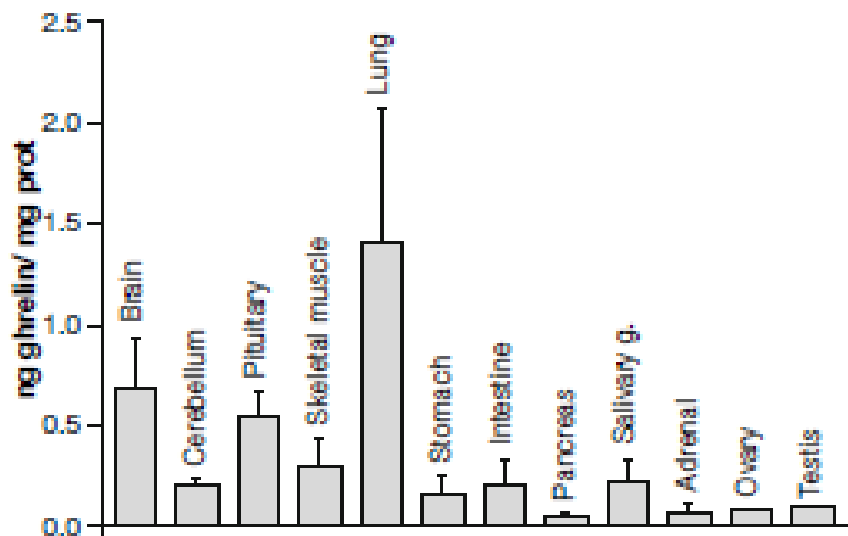


Figura 5: concentrazione proteica della grelina. Nel grafico sono mostrati i tessuti nei quali è stata determinata l'espressione della grelina. I dati sono stati ottenuti tramite tecnica immunoenzimatica (EIA) e la concentrazione della grelina è espressa come ng/mg delle proteine totali.

2.5.1 Storia ed effetti metabolici

La grelina è un ormone con importanti effetti metabolici che è stato inizialmente identificato come ligando endogeno per il recettore orfano del Secretagogo 1a del GH. Essa è caratterizzata da una forte attività di induzione del rilascio dell'ormone della crescita mediata dall'attivazione di recettori localizzati a livello del sistema nervoso centrale sia dentro che fuori la barriera emato-encefalica e dall'attivazione periferica del

sistema nervoso vagale³⁴. Successivamente alla sua scoperta, è stato documentato da Tshop et al l'importante ruolo che la grelina svolge nella regolazione del bilancio energetico: è stato visto che nei roditori la sua somministrazione esogena induce l'aumento di peso stimolando l'intake di cibo e riducendo l'utilizzazione del grasso³⁵ ed inoltre simili effetti sono stati osservati anche nell'uomo³⁶. Si è osservato inoltre che i livelli plasmatici di grelina sono ridotti nei soggetti obesi, e che condizioni che determinano perdita di peso ne aumentano invece la concentrazione. Questi dati nell'insieme indicano che la grelina ha una funzione a livello del sistema nervoso centrale nello stimolare l'intake calorico in condizioni di carenza energetica, venendo invece soppressa in condizioni di eccesso di energia. A questo proposito in un recente studio, Kischner et al suggeriscono una sua funzione come sensore di nutrienti lipidici che informa il sistema nervoso centrale della disponibilità di substrati³⁷. Studi successivi hanno inoltre attribuito alla grelina funzioni ulteriori, ed essa sembrerebbe avere un'attività nella stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene tramite l'induzione del rilascio di CRH e vasopressina, un ruolo nel controllo della motilità gastrica e della secrezione acida dello stomaco, ed un ruolo nella modulazione delle funzioni pancreatiche esocrine ed endocrine³⁸.

La grelina risulta quindi essere un ormone con importanti coinvolgimenti metabolici nella nutrizione, nella crescita e nel bilancio energetico. In aggiunta a tutto questo, recenti evidenze dimostrano un coinvolgimento della grelina anche a livello del sistema cardiovascolare, sul quale esercita effetti benefici.

2.6 Effetti cardiovascolari della grelina

Molte evidenze documentano la presenza della grelina e del suo recettore GHS-R a livello cardiovascolare: l'espressione della grelina è stata infatti rilevata con tecnica di immunoistochimica a livello dei cardiomiociti di atrio e ventricolo³³ e a livello di cellule endoteliali di arterie e vene, dove è contenuta all'interno di vescicole secretorie³⁹. In accordo con questo, studi condotti sia sugli animali che sull'uomo hanno dimostrato un ruolo di questo peptide a livello di questo sistema, con effetti protettivi cardiaci ed effetti sul tono vascolare periferico (figura 6).

2.6.1 Effetti cardiaci della grelina

In soggetti sani, l'infusione intravenosa di grelina è stata osservata migliorare l'output e la contrattilità cardiaca⁴⁰, mentre studi condotti sia in modelli animali che nell'uomo hanno evidenziato un effetto benefico di questo ormone a livello cardiaco in varie condizioni patologiche. Nell'ambito della patologia infartuale, la somministrazione di grelina in cuori isolati di ratto isolati e sottoposti a 30 minuti di ischemia seguiti da 120 minuti di riperfusione, ha ridotto significativamente la dimensione dell'area infartuata⁴¹.

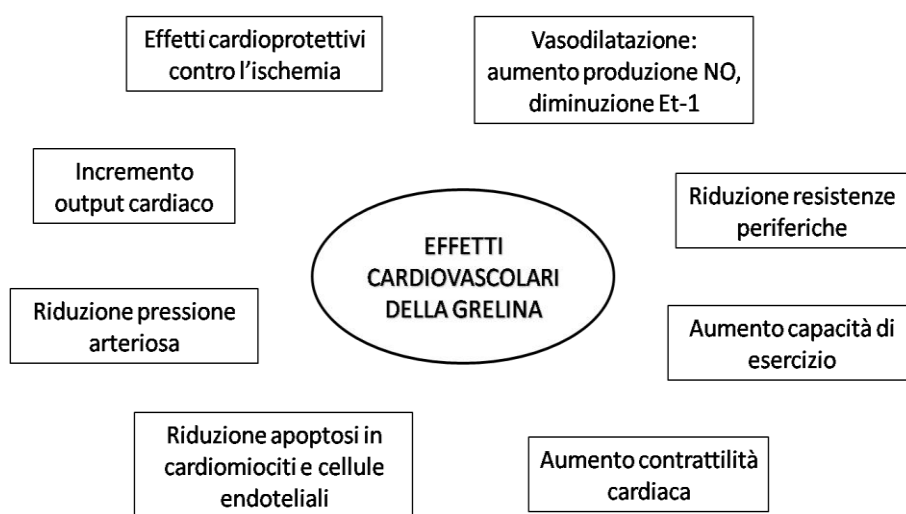


Figura 6: effetti cardiovascolari della grelina.

Anche il rimodellamento ventricolare post-infartuale sarebbe influenzato dall'effetto della grelina, come evidenziato dalla sua somministrazione nei ratti: in queste condizioni la grelina avrebbe l'effetto di attenuare l'ingrandimento del ventricolo sinistro indotto dall'infarto del miocardio. La grelina avrebbe inoltre un ruolo nell'attenuare la deposizione di collagene nel miocardio non infartuato e nel ridurre l'aumento della frequenza cardiaca e della concentrazione plasmatica della noradrenalina, eventi che solitamente si verificano in seguito all'infarto del miocardio⁴². In altri studi è stato evidenziato come gli effetti di questo ormone siano presenti anche nello scompenso cardiaco. La somministrazione di grelina, infatti, oltre ad aumentare significativamente l'output cardiaco, inibisce l'ingrandimento ventricolare e migliora la frazione di accorciamento del ventricolo sinistro di ratti affetti da insufficienza cardiaca cronica⁴³. Studi nell'uomo hanno inoltre evidenziato come la somministrazione di grelina sintetica in pazienti affetti da scompenso cardiaco abbia una importanza nel ridurre significativamente i livelli plasmatici di noradrenalina, nell'incrementare la frazione di eiezione ventricolare sinistra e nel migliorare la capacità di esercizio fisico⁴⁴. Anche in condizioni di cachessia cardiaca, sindrome spesso associata agli stati di

scompenso cardiaco terminale e caratterizzata da una progressiva perdita di peso e di massa muscolare, la grelina assumerebbe un'importanza come meccanismo compensatorio della condizione di importante catabolismo presente. I livelli sierici di questo ormone sono stati infatti ritrovati aumentati in pazienti cachettici con scompenso cardiaco e la grelina avrebbe in essi un ruolo nello stimolare l'intake di cibo e l'aumento di peso, con quindi un effetto anabolizzante che si contrappone alla condizione di depauperamento energetico presente⁴⁵.

Nell'intento di definire le modalità con cui la grelina esercita questi effetti a livello cardiaco, interessanti sono alcuni studi condotti in vitro che conferirebbero a questo ormone un ruolo nell'inibizione del meccanismo di apoptosi cellulare. L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata distinta dalla necrosi, che contribuisce al controllo del numero di cellule in un sistema, con un ruolo sia nello sviluppo che nel mantenimento della massa cellulare dei tessuti adulti. Studi condotti in modelli animali, hanno evidenziato un contributo di questo meccanismo nel determinare la morte dei miociti nelle condizioni di ipertensione e scompenso cardiaco⁴⁶⁻⁴⁸. Questo effetto sarebbe mediato dal recettore Fas, come indicato da uno studio condotto in cani affetti da cardiomiopatia dilatativa⁴⁹ e sia l'espressione di Fas, che più in generale

il meccanismo di apoptosi, sono stati collegati alla disfunzione cardiaca di pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa in uno studio condotto da Yamamura et al⁵⁰. Altri studi condotti in vitro con l'intento di evidenziare l'influenza della grelina sul meccanismo di apoptosi cellulare, hanno osservato che in cardiomiociti H9c2 incubati con Doxorubicina, sostanza con un ben conosciuto ruolo nell'indurre apoptosi, la morte cellulare Fas-mediata veniva pressochè completamente abolita dalla presenza dell'ormone. In questo studio sono stati inoltre indagati i meccanismi con cui la grelina si oppone all'apoptosi, ed è stata notata la capacità di questo ormone di attivare ERK1/2 e Akt, suggerendo che queste proteine siano coinvolte in una via di segnalazione cellulare antiapoptotica stimolata dalla grelina⁵¹. L'effetto antiapoptotico della grelina è stato inoltre correlato alla sua capacità di antagonizzare l'Angiotensina-II, un peptide con effetti sulle cellule del sistema cardiovascolare che riguardano la regolazione della crescita, della divisione e dell'apoptosi cellulare. E' stato osservato infatti che la grelina ostacola la morte Angiotensina II-indotta di cardiomiociti H9c2, andando a downregolare l'espressione del corrispondente recettore e prevenendo l'attivazione dello stress pathway del reticolo endoplasmatico⁵².

2.6.2 Effetti vascolari della grelina

Un ruolo della grelina a livello dei vasi periferici sarebbe caratterizzato dalla sua azione sulla modulazione della funzione endoteliale, regolata nei soggetti sani dal bilancio complessivo delle opposte azioni dei fattori endotelio-derivati NO ed endotelina (ET-1). Studi in vitro, documentano la capacità di questo ormone di stimolare in maniera dose-dipendente la produzione di NO in cellule endoteliali aortiche bovine ed umane. La produzione di NO veniva infatti bloccata se le cellule erano pretrattate con l'inibitore della NO-sintasi N^G-L-arginina-metil-estere (L-NAME) o con GHRP-6 (Growth hormon-releasing peptide 6), antagonista selettivo del recettore della grelina GHSR-1a⁵³. Altri studi documentano inoltre la capacità della grelina di indurre l'espressione della eNOS: in sezioni aortiche di ratti GH-deficienti cronicamente trattati con grelina, è stato infatti riscontrato un significativo miglioramento della capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente rispetto a quelli che venivano trattati con un placebo (figura 7)⁵⁴. Se considerati insieme, quindi, questi risultati documenterebbero la capacità della grelina di andare a stimolare in maniera GH indipendente la produzione di NO da parte dell'endotelio tramite l'espressione dell'enzima eNOS, utilizzando una via di segnalazione cellulare che coinvolge il GHSR-1a.

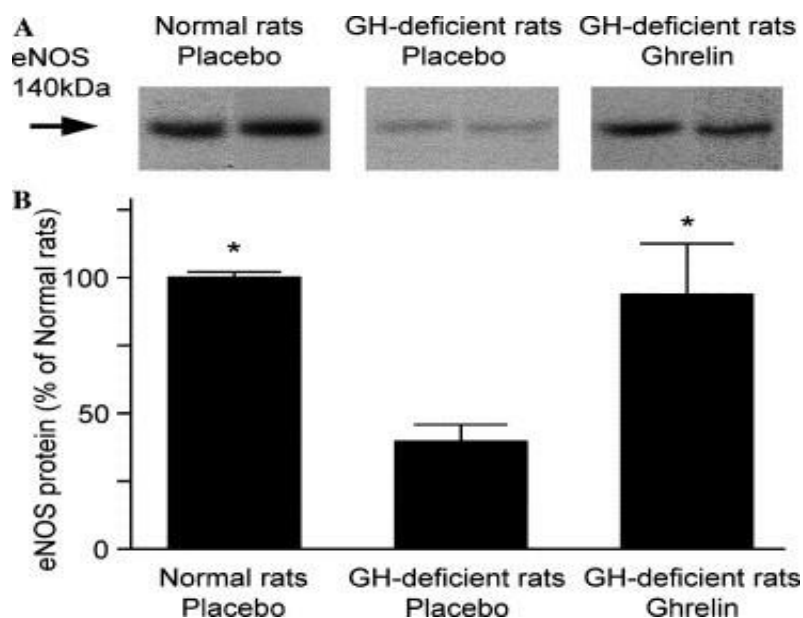


Figura 7: il grafico rappresenta i risultati per l'espressione di eNOS in sezioni aortiche di ratti normali trattati con placebo (sinistra), ratti con deficit di GH trattati con placebo (centro), e ratti con deficit di GH trattati con grelina (destra). Nel terzo gruppo viene riscontrato un significativo miglioramento della capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente rispetto ai gruppi trattati con un placebo.

Altri studi inoltre, dimostrano la capacità della grelina di avere un effetto sul tono vascolare andando ad agire sull'altro peptide coinvolto nella regolazione di questo processo, l'ET-1: nell'endotelio di arterie di pazienti con malattia coronarica, si è infatti osservato che la grelina era in grado di provocare una vasodilatazione endotelio-dipendente andando ad antagonizzare la contrazione ET-1-mediata⁵⁵.

2.6.3 Meccanismi coinvolti nella protezione vascolare della grelina

Nell'indagare quali siano i meccanismi tramite i quali la grelina produce degli effetti benefici a livello vascolare, importanti sembrano alcuni studi che evidenzerebbero un'azione positiva di questo ormone sulla disfunzione endoteliale tramite effetti antiinfiammatori ed antiossidanti. Il ruolo dell'infiammazione nel danno endoteliale sembra infatti importante, ed è stato evidenziato come le citochine pro-infiammatorie TNF- α e IL-6 siano coinvolte in questo fenomeno tramite la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Questo avviene con l'attivazione degli enzimi NADPH ossidasi e xantina ossidasi e conduce a una ridotta disponibilità di NO. IL-6 inoltre, stimola anche la sintesi della PCR, proteina prodotta dal fegato facente parte del gruppo delle proteine di fase acuta che vengono secrete durante uno stato infiammatorio, ed essa avrebbe un ruolo nell'andare a ridurre la disponibilità di NO deprimendo l'espressione dell'enzima eNOS⁵⁶. I meccanismi con cui la grelina ha un impatto positivo sulla funzione vascolare sembrano essere collegati ad una sua capacità di andare ad antagonizzare lo stato infiammatorio, ed è stato infatti recentemente dimostrato come questo ormone vada ad inibire la produzione di citochine pro-infiammatorie e l'attivazione di nf-kb (importante fattore di trascrizione coinvolto nelle vie di segnalazione

intracellulare pro-infiammatorie) in cellule endoteliali in vitro, e la produzione di citochine endotossina-indotte in vivo (figura 8)⁵⁷. Queste evidenze sono inoltre state confermate da ulteriori dati poiché si è visto che l'incubazione di grelina in sezioni aortiche di ratti affetti da ipertensione arteriosa essenziale, inibisce in maniera concentrazione-dipendente la produzione di ioni superossido, andando ad inibire l'enzima NADPH ossidasi⁵⁸. Altre indicazioni sugli effetti antiossidanti della grelina derivano dal fatto che questi si verificano anche in tessuti diversi dai vasi periferici, come il sistema digerente: nei ratti infatti la somministrazione periferica di grelina attenua il danno ischemico gastrico riducendo l'ulcerazione e la congestione tissutale⁵⁹. Altre evidenze indicano inoltre effetti antiossidanti di questo ormone anche a livello del sistema nervoso. Studi condotti in modelli sperimentali animali di crisi epilettica evidenziano un effetto dose-dipendente della grelina nell'attenuazione dello stress ossidativo pentilentetrazolo-indotto e nel prevenire la diminuzione di attività enzimatiche antiossidanti⁶⁰.

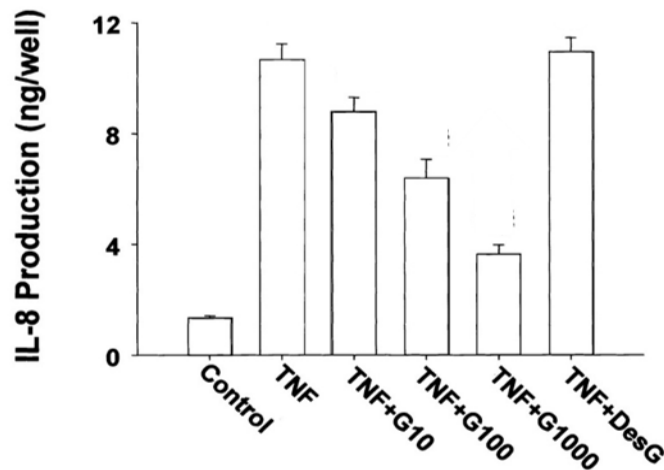


Figura 8: inibizione citochine TNF- α -indotte (IL-8) da parte della grelina in cellule endoteliali. La contemporanea somministrazione di grelina e TNF- α riduce la produzione di citochine infiammatorie in maniera dose-dipendente.

Un altro possibile meccanismo, non necessariamente alternativo a quello antiinfiammatorio/antiossidante sopra descritto, tramite il quale la grelina garantirebbe una protezione vascolare è l'induzione della produzione di NO tramite l'attivazione della via di segnalazione cellulare PI3-chinasi (PI3K)/Akt. In uno studio condotto in una coltura di cellule endoteliali aortiche bovine ed umane, è stata dimostrata la capacità della grelina di andare a stimolare la produzione di NO tramite un ruolo facilitatorio sull'attivazione di PI3K con conseguente fosforilazione di Akt, che a sua volta va ad attivare la eNOS⁵³.

2.7 Grelina e condizioni patologiche

Molti autori sono andati ad indagare il ruolo che la grelina può esercitare nell'ambito di condizioni patologiche caratterizzate dalla presenza di alterazioni della funzionalità vascolare e le evidenze più importanti degli effetti vascolari della grelina in condizioni "in vivo" sono state riscontrate in studi condotti in pazienti obesi affetti da sindrome metabolica e nell'ipertensione.

2.7.1 Grelina e Sindrome Metabolica

La Sindrome Metabolica è una condizione patologica gravata da un aumentato rischio cardiovascolare e caratterizzata dalla coesistenza di alterazioni metaboliche come obesità viscerale, ipertensione arteriosa, dislipidemia e diabete. Le alterazioni della funzionalità vascolare presenti in questi pazienti sono state messe in relazione con il ruolo che il grasso viscerale avrebbe nel provocare una condizione di infiammazione di basso grado, come quella che si verifica nei processi aterosclerotici⁶¹. La relazione esistente tra condizioni infiammatorie e generazione di ROS, danneggianti l'endotelio, è stata analizzata in laboratorio in piccole arterie di resistenza isolata dal tessuto adiposo di pazienti obesi ed i

risultati indicano che in questo distretto vascolare è presente una marcata condizione di disfunzione endoteliale, provocata dalla presenza della citochina infiammatoria TNF- α che promuove la sintesi di ROS andando ad attivare l'enzima NADPH ossidasi⁶².

Gli effetti della grelina in questi pazienti sono stati indagati in alcuni studi e Tesouro M et al hanno dimostrato che l'infusione di questo ormone nel microcircolo dell'avambraccio aumentava la disponibilità di NO andando a potenziare la risposta vasodilatatoria endoteliale all'acetilcolina (figura 9)⁶³ e che questo effetto veniva inibito dalla simultanea infusione dell'inibitore della NOS N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA)⁶³. Questo indica quindi che in pazienti con sindrome metabolica, la grelina ha un effetto benefico sulla disfunzione endoteliale andando ad aumentare la disponibilità di NO. Pazienti obesi affetti da sindrome metabolica sono inoltre caratterizzati da ridotti livelli di grelina circolante⁶³⁻⁶⁵ e da un aumentata capacità vasocostrittoria ET-1 mediata⁶⁶.

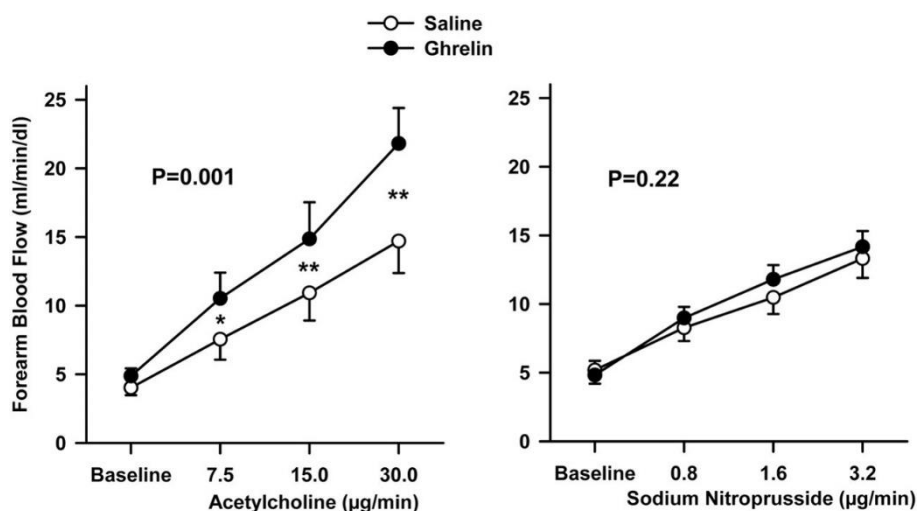


Figura 9: Valori di flusso di sangue dell'avambraccio in risposta a infusione intra-arteriosa di dosi crescenti di acetilcolina (sinistra) e SNP (destra) nei pazienti con sindrome metabolica durante l'infusione di soluzione fisiologica o di grelina in pazienti con sindrome metabolica. La grelina aumenta la risposta vasodilatatoria endotelio-dipendente all'acetilcolina. Nessun effetto sulla vasodilatazione endotelio-indipendente.

Questi dati fanno dell'obesità un utile modello sperimentale per lo studio dell'impatto della grelina sulla modulazione complessiva della funzione endoteliale tramite effetti sia su NO che su ET-1 ed infatti, con questo intento, Tesaro M et al sono andati a valutare se l'infusione di grelina potesse avere un effetto benefico sullo squilibrio tra NO ed ET-1 nel microcircolo dell'avambraccio di pazienti con obesità sindrome metabolica-correlata. La disponibilità di NO è stata studiata tramite l'infusione di L-NMMA mentre la vasocostrizione ET-1 mediata è stata investigata utilizzando BQ-123, antagonista del recettore ET_A. Lo studio ha evidenziato che in condizioni basali i pazienti mostravano una

maggior risposta vasodilatatoria a BQ-123 e un ridotto effetto vasocostrittorio di L-NMMA se comparati ai controlli. Lo squilibrio tra vasocostrizione ET-1 mediata e vasodilatazione NO-dipendente veniva però migliorato dall'infusione di grelina esogena, che andava quindi in particolare a ridurre la capacità vasocostrittoria ET-1 dipendente ed a migliorare la vasodilatazione NO-dipendente⁶⁷.

2.7.2 Grelina ed ipertensione

Studi condotti in coorti di pazienti ipertesi di media età hanno dimostrato un'associazione negativa tra grelina e ipertensione arteriosa, facendo supporre che essa possa partecipare alla regolazione della pressione arteriosa specialmente nelle condizioni di ipertensione arteriosa⁶⁸. Nella stessa popolazione è stato inoltre documentato come mutazioni in questo ormone possano essere fattori di rischio indipendenti per l'ipertensione ed è stato osservato infatti come la mutazione Arg51Gln sia correlata con basse concentrazioni plasmatiche di grelina⁶⁹. Nell'indagare quali siano i meccanismi fisiopatologici implicati nei ridotti livelli plasmatici di grelina in pazienti ipertesi, un ruolo importante è stato attribuito allo stato di insulino-resistenza, condizione che risulta essere presente in una buona percentuale di pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale⁷⁰. A

supporto di questa correlazione, studi condotti in pazienti caratterizzati da altre condizioni di insulino-resistenza come sindrome metabolica obesità-correlata e sindrome dell'ovaio policistico, hanno confermato come questo sia uno stato accompagnato da ridotti livelli di grelina^{63,71}. Il meccanismo con il quale la grelina può partecipare alla regolazione della pressione sanguigna, è stato proposto essere la modulazione del sistema nervoso simpatico. Conferme in questo senso vengono dal fatto che la somministrazione di grelina all'interno dei ventricoli cerebrali di coniglio è capace di sopprimere l'attività delle fibre nervose simpatiche presenti a livello del rene, di ridurre la pressione arteriosa e di migliorare il controllo dell'attività simpatica renale riflesso barocettivo-correlata⁷². Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato che l'iniezione di grelina all'interno del nucleo del tratto solitario di ratto, riduce in maniera significativa la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca e deprime l'attività delle fibre simpatiche renali⁷³. Questi dati indicano quindi che, in questi modelli sperimentali, la grelina agisce a livello del sistema nervoso centrale per ridurre la pressione arteriosa e l'attività simpatica renale e che inoltre, la sua azione a livello del nucleo del tratto solitario ha una funzione nel deprimere l'attività simpatica e la pressione arteriosa.

In conclusione, la grelina, ormone inizialmente noto per le sue funzioni di regolazione del bilancio energetico, ha più recentemente acquistato importanza per le sue implicazioni a livello cardiovascolare, con effetti che vanno da benefici a livello cardiaco ad un attivo ruolo sulla funzione endoteliale vascolare periferica. I suoi effetti sono stati studiati in modelli di patologia come quello della sindrome metabolica, dove questo ormone ha la capacità di migliorare la condizione di disfunzione endoteliale presente, tramite proprietà antiossidanti ed antiinfiammatorie. I suoi effetti sono stati inoltre studiati nell'ipertensione arteriosa, dove mostra la capacità di ridurre i livelli di pressione arteriosa tramite un meccanismo che sembra collegato con la modulazione del sistema nervoso simpatico. In questo quadro, essendo l'ipertensione, come citato in precedenza, una condizione caratterizzata da una alterazione della funzione endoteliale e da una ridotta disponibilità di NO, sembra verosimile che la grelina possa esercitare un'azione nell'ambito della funzione vascolare anche di pazienti ipertesi, anche se a tutt'oggi non ci sono dati in supporto e tali effetti restano sconosciuti.

3. STUDIO

3.1 Scopo della tesi

Da quanto esposto nei paragrafi precedenti, si evince come l'ipertensione rappresenti un modello ideale per lo studio degli effetti vascolari della grelina. Infatti, la condizione di disfunzione endoteliale che la caratterizza è causata da una ridotta disponibilità di NO a sua volta dovuta alla presenza di stress ossidativo indotto da radicali liberi dell'ossigeno ed è già stato discusso come la grelina possa avere influenze su queste condizioni. Sebbene sia stato evidenziato come in altre condizioni patologiche la grelina abbia la proprietà di andare a migliorare la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente, il reale impatto di questo ormone sulla funzione endoteliale di pazienti affetti da ipertensione essenziale non è mai stato investigato. Lo scopo di questo studio è stato quello di andare a valutare se l'infusione esogena di grelina potesse migliorare la condizione di disfunzione endoteliale nel microcircolo dell'avambraccio di pazienti con ipertensione essenziale. Abbiamo inoltre valutato la possibilità che gli effetti benefici sulla

funzione endoteliale potessero essere attribuiti ad un miglioramento dello stress ossidativo e dello stato di infiammazione di basso grado presente in questi pazienti.

3.2 Metodi

3.2.1 Popolazione dello studio

Lo studio include 18 pazienti ipertesi essenziali (EH) e 18 soggetti normotesi di controllo (NS). Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Pisa e tutti i partecipanti hanno dato consenso scritto allo studio.

3.2.2 Modello sperimentale

La funzione endoteliale nel microcircolo è stata valutata tramite studi di reattività vascolare con il modello mininvasivo dell'avambraccio isolato e perfuso (Forearm Blood Flow=FBF). Come già descritto nei paragrafi precedenti, con questa tecnica è possibile infondere direttamente a livello del distretto esplorato sostanze con effetti sul tono vascolare. Tali sostanze sono infuse a dosi tali da determinare elevate concentrazioni

plasmatiche locali, senza interferire sull'emodinamica sistemica. In questo studio, dopo un digiuno notturno e con paziente in posizione supina, è stata cannulata l'arteria brachiale per l'infusione farmacologica, andando poi a valutare la risposta vascolare provocata mediante pletismografia venosa a strain-gauge. Il flusso plasmatico è stato misurato in entrambi gli avambracci, poiché il confronto con le misure ottenute dal braccio controlaterale non perfuso è importante per escludere che gli effetti registrati a livello dell'avambraccio perfuso non dipendano da modificazioni emodinamiche di carattere sistemico. In aggiunta, per consentire prelievi venosi, è stato posizionato un accesso venoso a livello della vena cefalica dell'avambraccio esaminato.

3.3 Disegno dello studio

La progettazione dello studio è riassunta nella figura 10. Sia nei pazienti ipertesi che nei normotesi, la vasodilatazione endotelio-dipendente è stata studiata attraverso una curva dose-risposta ottenuta durante l'infusione intra-arteriosa di acetilcolina (Ach in dosi incrementali e cumulative: da 0,45 a 15µg/100ml tessuto avambraccio/min, 5 minuti ciascuna dose). La

vasodilatazione endotelio-indipendente è stata studiata attraverso una curva dose-risposta ottenuta durante l'infusione intra-arteriosa di nitroprussiato di sodio (SNP in dosi incrementali e cumulative: da 1 a 4µg/100ml tessuto avambraccio/min, 5 minuti ciascuna dose).

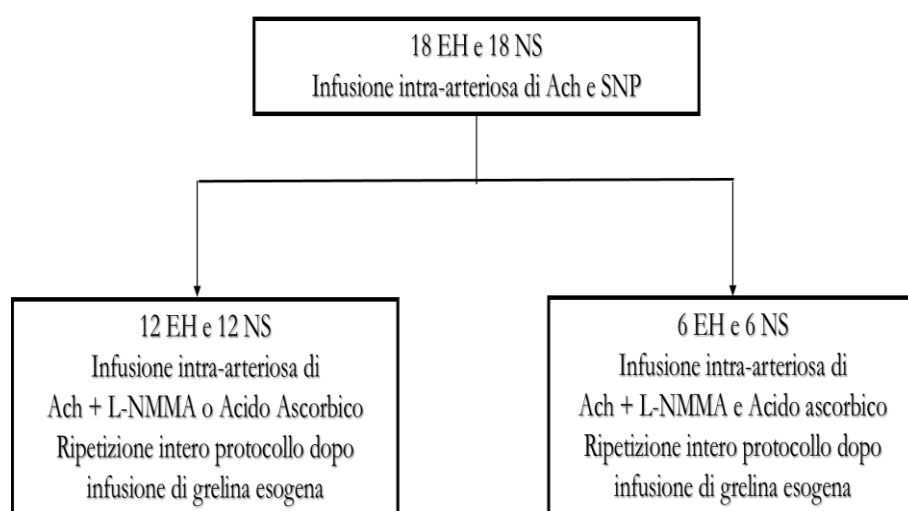


Figura 10: diagramma schematico della progettazione dello studio.

3.3.1 Valutazione del ruolo di L-NMMA od acido ascorbico sulla risposta vascolare all'Acetilcolina. Effetto della grelina

In un sottogruppo di 12 EH e di 12 NS, la biodisponibilità di NO è stata valutata ripetendo la curva dose-riposta all'acetilcolina in presenza di

infusione intra-arteriosa dell'inibitore della eNOS N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA, 100µg/100ml tessuto avambraccio/min).

Per evitare le modificazioni di flusso basale indotte dalla L-NMMA, è stata applicata la tecnica dell'NO-clamp, il quale consente di valutare gli effetti degli agonisti endotelio-dipendenti durante blocco della NO sintetasi senza modificare il flusso arterioso. La tecnica consiste nel co-infondere dopo 10 minuti di infusione di L-NMMA anche nitroprussiato di sodio (0.2 e 0.4µg/100ml tessuto per 5min in EH e in NS rispettivamente) al fine di neutralizzare la vasocostrizione indotta dalla L-NMMA e ripristinare il flusso basale. Il ruolo dei ROS nella vasodilatazione endotelio-dipendente è stato valutato ripetendo la curva all'acetilcolina in presenza di infusione intra-arteriosa dell'antiossidante Acido ascorbico (8ml/100ml/tessuto avambraccio/min). Al termine, dopo un adeguato washout per permettere il ritorno dei valori del flusso ai livelli basali, è stata effettuata un'infusione intra-arteriosa di grelina acilata esogena umana (Bachem), a 200ng/min, dosaggio scelto in conformità con precedenti studi condotti sull'uomo³⁶. Dopo 30 minuti di infusione di grelina, sono state ripetute le curve dose-risposta all'Acetilcolina e al Nitroprussiato di sodio con o senza L-NMMA o

acido ascorbico, mentre l'infusione del peptide veniva mantenuta invariata.

3.3.2 Valutazione del ruolo di L-NMMA ed acido ascorbico sulla risposta vascolare all'Acetilcolina. Effetto della grelina

Per valutare specificamente l'influenza dello stress ossidativo sulla disponibilità di NO, in un sottogruppo di 6 EH e 6 NS è stata ripetuta l'infusione di Acetilcolina simultaneamente a quella di L-NMMA ed acido ascorbico. Successivamente, lo stesso procedimento è stato ripetuto dopo somministrazione intra-arteriosa di grelina.

3.3.3 Effetto della grelina in acuto su marcatori plasmatici di stress ossidativo e infiammazione

Nello stesso momento, sono stati anche valutati l'entità dello stress ossidativo e i livelli di infiammazione. Questo è stato effettuato tramite prelievi venosi nei quali si andavano a misurare malondialdeide (MDA) e lipoperossidi (LOOH), marker plasmatici di stress ossidativo, ed IL-6, marker di infiammazione. In aggiunta, è stata misurata la capacità del plasma di ridurre gli ioni ferrici a ferrosi (FRAP), indice della capacità antiossidante endogena. Similarmente ai modelli precedenti, la

valutazione di questi marcatori è stata effettuata sia a livelli basali, che dopo 30 minuti di infusione di grelina.

3.4 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il software GraphPadPrism ed i risultati sono stati espressi come media \pm SEM (errore standard). Le differenze tra i soggetti ipertesi e normotesi in termini di caratteristiche cliniche e parametri umorali sono state comparate utilizzando il test t di Student per campioni indipendenti o χ^2 , quando rispettivamente appropriati. Per quanto riguarda la funzione endoteliale, i dati sono stati analizzati in termini di variazione di FBF, e le variazioni di FBF sono state prese come evidenza di vasodilatazione locale. La risposta all'Acetilcolina e al nitroprussiato di sodio è stata analizzata utilizzando il test ANOVA per misure ripetute, seguito dal test di Bonferroni per confronti post hoc. Le differenze sono state considerate statisticamente significative al valore di $P < 0.05$.

3.5 Risultati

Le caratteristiche basali cliniche e umorali di tutti i partecipanti sono riassunte nella Tabella 1.

	Soggetti normotesi (n=18)	Pazienti ipertesi essenziali (n=18)
Età (anni)	50.5±3.5	51.8±8.1
Sesso (M/F)	12/6	13/5
BMI (kg/m ²)	25.8±2.7	24.8±4.7
PA sistolica (mmHg)	125.8±6.3	148.5±8.3*
PA diastolica (mmHg)	79.6±7.5	95.9±7.5*
Frequenza cardiaca (bpm)	68.7±11.1	70.7±9.1
Greline plasmatica (pg/mL)	1066±101	762±125*
Colesterolo totale (mg/dL)	198.0±27.5	207.1±22.5
Colesterolo HDL (mg/dL)	46.3±8.1	48.5±7.3
Trigliceridi (mg/dL)	119.3±26.2	126.3±21.2
Colesterolo LDL (mg/dL)	128.2±20.9	133.3±19.3
Glicemia (mg/dL)	83.6±5.4	88.6±7.9
eGFR (mL/min/1.73m ²)	92.8±12.0	96.8±18.1

Tabella 1: caratteristiche cliniche dei soggetti normotesi e dei pazienti ipertesi.

*P<0.05

I valori plasmatici basali della grelina sono risultati essere significativamente ridotti negli EH rispetto a NS. Durante l'infusione farmacologica frequenza cardiaca e pressione arteriosa media non hanno subito cambiamenti significativi, indicando che durante la procedura non si sono verificati effetti emodinamici sistemici.

3.5.1 Risultati basali nei soggetti ipertesi essenziali e nei normotesi

Nei pazienti ipertesi essenziali la risposta all'Ach (incremento di FBF rispetto al basale: da 2.9 ± 0.4 a 12.5 ± 0.8 ml/100ml/min) è risultata ridotta rispetto al gruppo di soggetti normotesi (FBF da 3.0 ± 0.4 a 17.4 ± 0.6 ml/100 ml/min) (figura 11).

Al contrario la risposta al SNP è risultata essere simile nei soggetti ipertesi (FBF da 2.9 ± 0.3 a 14.6 ± 0.7 ml/100 ml/min; incremento percentuale $+413 \pm 31\%$) e nei normotesi (FBF da 2.9 ± 0.3 a 15.1 ± 0.6 ml/100ml/min; $+419 \pm 36\%$).

Nei normotesi, l'infusione di L-NMMA bloccava l'effetto vasodilatatorio indotto dall'Ach (FBF: basale 3.0 ± 0.5 , L-NMMA: 2.1 ± 0.2 , L-NMMA + SNP: 3.0 ± 0.3 ; L-NMMA + SNP + Ach: 11.6 ± 0.6 ml/100 ml/min) (figura 11).

L'acido ascorbico non modificava la risposta all'acetilcolina (FBF: basale 2.9 ± 0.4 , Asc acid: 3.0 ± 0.2 , Asc acid + Ach; 17.2 ± 0.6 ml/100ml/min; $P=N.S.$ vs Ach singola) o l'effetto inibitorio di L-NMMA su di essa (FBF: basale 3.0 ± 0.4 ; L-NMMA: 2.1 ± 0.3 , L-NMMA + Asc acid + SNP: 3.0 ± 0.3 ; L-NMMA + Asc acid + SNP + Ach: 11.4 ± 0.7 ml/100ml/min) (figura 11).

Nei soggetti ipertesi, L-NMMA non modificava significativamente la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina, mentre l'acido ascorbico potenziava la risposta all'acetilcolina e ripristinava l'effetto inibitorio della L-NMMA sulla stessa (figura 11).

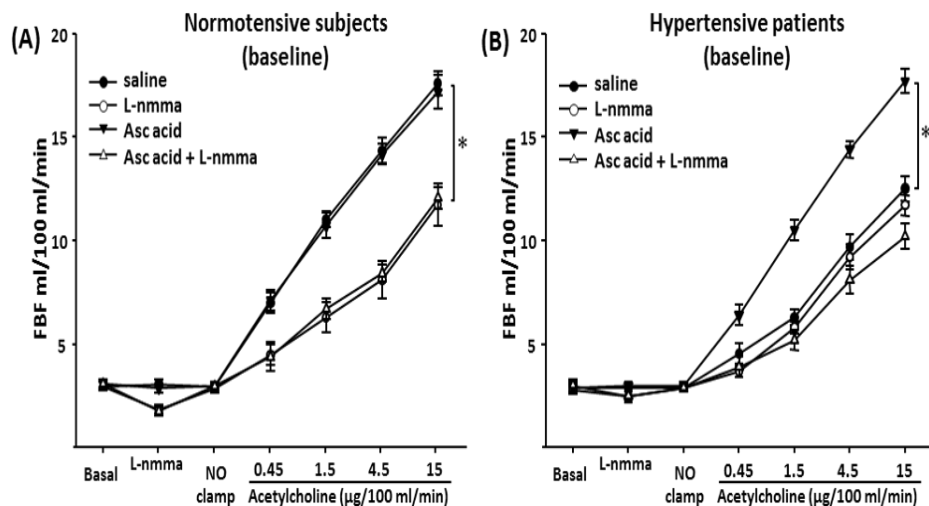


Figura 11: risultati basali nei soggetti normotesi (A) e nei pazienti ipertesi essenziali (B).

3.5.2 Effetto della grelina sulla vasodilatazione endotelio-dipendente

In entrambi i gruppi in esame, l'infusione intra-arteriosa della grelina non ha comportato modificazioni significative sul flusso basale.

Nel gruppo dei normotesi, l'infusione intra-arteriosa della grelina ha aumentato i livelli venosi del peptide (da 1066 ± 101 a 1681 ± 270 pg/ml; $P < 0.01$).

In questi soggetti è stato osservato che la grelina non modificava la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina (FBF da 3.1 ± 0.4 a 17.7 ± 0.7 ml/100ml/min; $+469 \pm 34\%$), l'inibizione di L-NMMA sulla risposta all'acetilcolina (FBF: basale 3.1 ± 0.3 ; grelina + L-NMMA: 2.1 ± 0.4 , grelina + L-NMMA + SNP: 3.1 ± 0.3 ; grelina + L-NMMA + SNP + Ach: 11.7 ± 0.4 ml/100ml/min; $+277 \pm 28\%$), o il limitato effetto dell'acido ascorbico sulla risposta all'acetilcolina (FBF: basale 2.9 ± 0.5 ; grelina + Asc acid : 3.1 ± 0.4 ; grelina + Asc acid + Ach: 17.3 ± 0.5 ml/100ml/min; $+457 \pm 21\%$).

Negli ipertesi, l'infusione intra-arteriosa della grelina ha determinato un importante incremento dei livelli venosi del peptide (da 762 ± 125 a 1428 ± 170 pg/ml; $P < 0.01$), che sono risultati non molto differenti da quelli ottenuti nei normotesi. L'infusione della grelina ha aumentato la risposta vasodilatatoria all'acetilcolina ($+447 \pm 55\%$; $P < 0.01$), e ha

aumentato l'inibizione di L-NMMA sulla risposta all'acetilcolina ($+286\pm43\%$). In aggiunta, dopo l'infusione di grelina, l'acido ascorbico modificava solo leggermente ed in maniera non significativa la risposta all'acetilcolina ($+486\pm44\%$) e l'effetto inibitorio di L-NMMA sulla vasodilatazione indotta dall'acetilcolina ($+278\pm39\%$) (figura 12).

In entrambi i gruppi, la grelina non è stata vista essere in grado di modificare la risposta al SNP.

Durante l'intero svolgimento dello studio, i livelli di FBF nell'avambraccio controlaterale non hanno dimostrato cambiamenti significativi, confermando che gli effetti registrati non dipendevano da modificazioni emodinamiche di carattere sistemico.

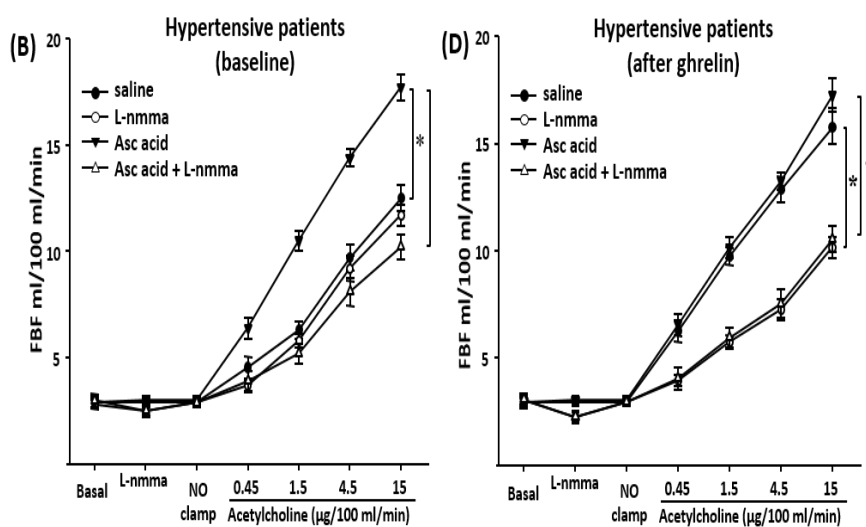


Figura 12: effetto della grelina sulla funzione endoteliale dei pazienti ipertesi (D). Confronto con i risultati basali degli stessi soggetti (B).

3.5.3 Effetto della grelina sui marcatori plasmatici di infiammazione e stress ossidativo

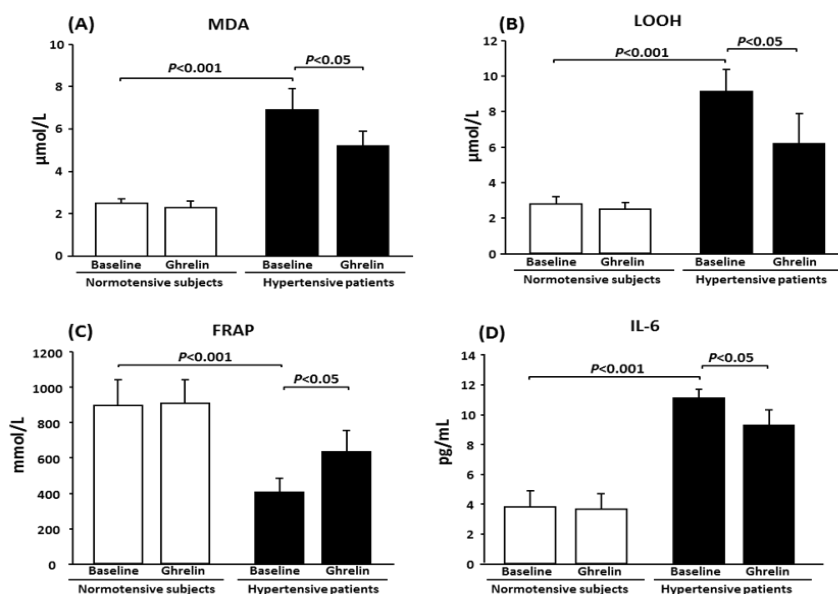


Figura 13: effetto della grelina sui marcatori plasmatici di stress ossidativo e di infiammazione.

In condizioni basali, i soggetti ipertesi hanno mostrato avere livelli plasmatici di MDA, LOOH e IL-6 significativamente più elevati di quelli presentati dai normotesi, e valori di FRAP ridotti (figura 13). Dopo 30 minuti di infusione di grelina è stato osservato che questo peptide determinava nel gruppo degli ipertesi una marcata diminuzione delle concentrazione venose di MDA, LOOH e IL-6 rispetto ai livelli basali ed un concomitante incremento dei valori di FRAP. Al contrario, nel gruppo

dei normotesi, l'infusione della grelina non modificava in maniera significativa questi parametri.

3.6 Discussione

In questa tesi è stato valutato l'effetto dell'infusione di grelina esogena sulla vasodilatazione endotelio-dipendente nel microcircolo dell'avambraccio di pazienti ipertesi essenziali.

In accordo con precedenti osservazioni⁷⁴, i pazienti ipertesi essenziali reclutati in questo studio hanno dimostrato in condizioni basali una ridotta capacità vasodilatatoria in risposta all'acetilcolina rispetto ai soggetti normotesi di controllo. Inoltre, la ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente non era modificata in alcun modo dalla simultanea infusione di L-NMMA, confermando la condizione di ridotta biodisponibilità di NO presente nei pazienti ipertesi essenziali. In questi stessi soggetti, l'infusione intra-arteriosa di acido ascorbico potenziava la risposta vasodilatatoria endotelio-dipendente e ripristinava l'inibizione della L-NMMA, indicando che la ridotta attività di NO che caratterizza i pazienti ipertesi può essere attribuita ad una condizione di aumentato

stress ossidativo. I risultati ottenuti in questo studio permettono di analizzare l'impatto della grelina sulla funzione endoteliale poiché si osserva che, in questi pazienti, la sua infusione esogena è in grado di incrementare la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente e di ripristinare l'effetto inibitorio di L-NMMA nei confronti della vasodilatazione indotta dall'acetilcolina. In queste condizioni l'acido ascorbico non è più in grado di influenzare la risposta all'acetilcolina o l'effetto inibitorio di L-NMMA. Queste scoperte rappresentano la prima dimostrazione in pazienti ipertesi essenziali della capacità della grelina di ristabilire la disponibilità endoteliale di NO nel microcircolo periferico, con un effetto benefico sulla condizione di disfunzione endoteliale che caratterizza questi pazienti. Questi dati sono in completo accordo con i risultati che sono stati ottenuti in altre patologie caratterizzate da una alterata funzione endoteliale, come quelli già precedentemente elencati di Tesouro et al che dimostrano la capacità della grelina di migliorare la vasodilatazione endotelio-dipendente andando ad aumentare la disponibilità di NO in pazienti con sindrome metabolica⁶³. I possibili meccanismi attraverso i quali la grelina potrebbe esercitare il proprio effetto benefico sulla funzione endoteliale, sembrano dovuti alle proprietà antiossidanti del peptide. Tale ipotesi, può essere effettuata in

base all'analisi dei risultati dei dosaggi dei parametri di stress ossidativo e di infiammazione. Infatti, nei pazienti ipertesi, l'infusione acuta di grelina riduceva drasticamente gli elevati livelli plasmatici di LOOH e di MDA (markers sierici di stress ossidativo) e di IL-6 (importante citochina infiammatoria), con un concomitante incremento dei livelli plasmatici di FRAP (indice della capacità antiossidante endogena). Inoltre, a sostegno di questa ipotesi, sembrano importanti i risultati ottenuti dagli esperimenti con l'elemento antiossidante acido ascorbico, nei quali si osservava che l'effetto potenziante di esso sulla vasodilatazione indotta dall'acetilcolina e sull'inibizione esercitata da L-NMMA sull'acetilcolina non era più presente dopo l'infusione della grelina. L'effetto benefico che l'acido ascorbico esercitava sulla funzione endoteliale in condizioni basali veniva quindi annullato dopo l'infusione della grelina, suggerendo un effetto analogo da parte dei due elementi sulla funzione endoteliale. Tali dati sono inoltre in accordo con i già citati studi che evidenziano le proprietà antiossidanti ed antiinfiammatorie di questo peptide^{30,31}, e i risultati di questo studio suggeriscono quindi in definitiva che il ruolo benefico della grelina sulla funzione endoteliale di pazienti ipertesi sia dovuto ad un antagonismo nei confronti dei ROS e

dei mediatori dell'inflammation conducente ad un miglioramento della funzione endoteliale e della disponibilità di NO.

In conclusione, i risultati di questa tesi dimostrano che l'infusione intrarteriosa acuta di grelina esercita un importante effetto benefico vascolare nel microcircolo di pazienti affetti da ipertensione essenziale. Essa infatti è in grado di migliorare la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente andando a ripristinare la biodisponibilità di NO, condizione che risulta compromessa in questi soggetti ed il meccanismo tramite il quale ciò avviene è probabilmente dovuto alla attività antiinflammatoria ed antiossidante che è ascrivibile a questo peptide. I risultati di questo studio possono dunque essere utili per migliorare la conoscenza degli eventi che caratterizzano disfunzione endoteliale, e che la legano allo stress ossidativo e ad una condizione di inflammation di basso grado. Inoltre queste scoperte, se considerate insieme alle evidenze che si hanno in altre condizioni patologiche, arricchiscono le conoscenze sugli effetti cardiovascolari di questo peptide e lo rendono un promettente target per la futura ricerca in ambito cardiovascolare.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. *BioMed Research International* 2014; 2014: 801896.
2. Gori T, Dragoni S, di Stolfo G, Forconi S. Endothelium and haemorheology. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 2007; 43: 124–129.
3. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 1989; 65: 1-21.
4. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation and endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984-991.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.

6. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92: 3337-3349.
7. Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cellular and molecular life sciences* . CMLS 2011; 68: 195-203.
8. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2863-2867.
9. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Luscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 1994; 89: 1203-1208.
10. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998; 16: 1081-1098
11. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the

- International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-265.
12. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: p. 22-27.
 13. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation* 1990; 81: p. 1762-1767.
 14. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993; 21(6 Pt 2): 929-933.
 15. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 1995; 91: 1981-1987.
 16. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Natali A, Ferrannini E, Salvetti A. Effect of insulin on acetylcholine-induced vasodilation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 1995; 92: 2911-2918.

17. Taddei S, Mattei P, Viridis A, Sudano I, Ghiadoni L, Salvetti A. Effect of potassium on vasodilation to acetylcholine in essential hypertension. *Hypertension* 1994; 23: 485-490.
18. Creager MA, Roddy MA. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension* 1994; 24: 499-505.
19. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension: evidence that the abnormality is not at the muscarinic receptor level. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 23: 1610-1616.
20. Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 1995; 91: 1732-1738.
21. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Buralli S, Salvetti A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired

- nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation* 1999; 100: 1400-1405.
22. Ghiadoni L, Huang Y, Magagna A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Effect of acute blood pressure reduction on endothelial function in the brachial artery of patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2001; 19(3 Pt 2): 547-551.
 23. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, Giulini SM, Agabiti-Rosei E. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension* 1996; 28: 785-790.
 24. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 1298-1303.
 25. Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 938-945.

26. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87: 1468-1474.
27. Solzbach U, Hornig B, Jeserich M, Just H. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation* 1997; 96: 1513-1519.
28. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
29. Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regulatory peptides* 2001; 99: 141-150.
30. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical research communications* 2000; 279: 909-913.

31. Rodriguez A. Novel molecular aspects of ghrelin and leptin in the control of adipobiology and the cardiovascular system. *Obesity facts* 2014; 7: 82-95.
32. Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S et al. Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *Journal of endocrinological investigation* 2006; 29: 115-121.
33. Ganapavan S, Kola B, Bustin SA et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 2002; 87: 2988-2991.
34. Date Y, Murakami N, Toshinai K et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120-1128.
35. Tshop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913.
36. Neary NM, Small CJ, Wren AM et al. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute,

- randomized, placebo-controlled trial. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2004; 89: 2832-2836.
37. Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ et al. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. Nature Medicine 2009; 15: 741-745.
38. Otto B, Spranger J, Benott SC et al. The many faces of ghrelin: new perspectives for nutrition research? The British journal of nutrition 2005; 93: 765-771.
39. Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, Davenport AP. Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. Cardiovasc Res 2006; 69: 227-235.
40. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. American journal of physiology 2001; 280: R1483-1487.
41. Frascarelli S, Ghelardoni S, Ronca-Testoni S, Zucchi R. Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart. Basic research in cardiology 2003; 98: 401-405.

42. Soeki T, Kishimoto J, Schwenke DO et al. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2008; 294: H426-432.
43. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M et al. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001; 104: 1430-1435.
44. Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y et al. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure, *Circulation* 2004; 110: 3674-3679.
45. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001; 104: 2034-2038.
46. Hamet P, Richard L, Dam TV et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 1995; 26: 642-648.

47. Sharov VG, Sabbath HN, Shimoyama H et al. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *The American journal of pathology* 1996; 148: 141-149.
48. Tanaka M, Ito H, Adachi S et al. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation research* 1994; 75: 426-433.
49. Anker SD, Ponikowski P, Varney S et al. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 1997; 349: 1050-1053.
50. Yamamura T, Nakamura H, Yamamoto T et al. Fas expression and apoptosis correlate with cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. *Japanese circulation journal* 1999; 63: 149-154.
51. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI-3 kinase/AKT. *The journal of cell biology* 2002;159: 1029-1037.

52. Yang C, Wang Y, Liu H et al. Ghrelin protects H9c2 cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis through the endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2012; 59: 465-471.
53. Iantorno M, Chen H, Kim JA et al. Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E756-764.
54. Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y et al. Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 830-835.
55. Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 1146-1152.
56. Virdis A, Schiffrin EL. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 181-187.

57. Li WG, Gavrilu D, Liu X et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004; 109: 2221-2226.
58. Kawczynska-Drozdz A, Olszanecki R, Jawien J et al. Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertense* 2006; 19: 764-767.
59. El Eter E, Al Tuwaijiri A, Hagar H, Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2007; 22: 1791-1799.
60. Obay BD, Tasdemir E, Tumer C et al. Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides* 2008; 29: 448-455
61. Virdis A, Ghiadoni L, Masi S et al. Obesity in the childhood: a link to adult hypertension. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1063-1071.
62. Virdis A, Santini F, Colucci R et al. Vascular generation of tumor necrosis factor- α reduces nitric oxide availability in

- small arteries from visceral fat of obese patients. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 238-247.
63. Tesouro M, Schinzari F, Iantorno M et al. Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2986-2992.
 64. Tshop M, Weyer C, Tataranni PA et al. Plasma ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-709.
 65. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 2002; 87: 240-244.
 66. Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza JA. Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension* 2004; 43: 36-40.
 67. Tesouro M, Schinzari F, Rovella V et al. Ghrelin restores the endothelin1/nitric oxide balance in patients with obesity-related metabolic syndrome. *Hypertension* 2009; 54: 995-1000.
 68. Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S et al. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension,

- and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2546-2553.
69. Poykko S, Ukkola O, Kauma H et al. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of a middle-aged subjects. *Diabetologia* 2003; 46: 455-458.
70. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R et al. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 1987; 317: 350-357.
71. Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V et al. Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: correlation with insulin resistance and androgens levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5625-5629.
72. Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujii K et al. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension* 2002; 40: 694-699.
73. Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M et al. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension* 2004; 43: 977-982.

74. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Luscher TF, Schechter M, Taddei S, Vita JA, Lerman A. The assessment of endothelial function: From research into clinical practice. *Circulation* 2012; 126: 753-767.